

作用物質の吸収スペクトル

〔I〕紫外部および可視部

山 辺 茂

1. 序 論

作用物質とは、生体に比較的微量ふくまれていて色々の生理作用に触媒的に、または栄養的にはたらく物質と、生体とくに人体に外界から比較的少量あたえられて種々の薬理効果を示す物質との総称である。鉄・マンガン・亜鉛などの無機化合物も最近その作用が注目されてきたが、作用物質の多くは有機化合物であって、酵素・ビタミン・ホルモン・細菌毒素・抗体・多くの医薬品がこれに入る。これらの作用物質によって生体は正常な生理作用を行いうるとともに、不調時には機能の正常化をはかることができる。

作用物質にはどんな種類、つまり構造の化合物があるか（定性分析）？ 細胞のどの部分にどの位の量がふくまれているか（定量分析）？ 作用物質はどのような細胞受体と結合して効果を生ずるか（作用機序）？ 作用物質の研究にとって本質的なこれらの問題は自然科学の多くの分野にわたるために、色々の角度からの考察が可能でありまた必要であるが、理論および実験技術において最近いちじるしく進歩した物理化学がこの問題の解明に有力な手段を提供するようになってきた。吸収スペクトルによる作用物質の研究は、このような領域の最も代表的なものの1つであり、その応用もまた広範囲におよぶ。本論文の主題もこの点にある。

吸収スペクトルはもともと物理学の分野で誕生したものであるが、多くの化学物質がその対象として取扱われているうちに、物理化学の領分にとり入れられてしまった。本論文は吸収スペクトルの本質的な性格をいくつかの項目にわ

けて論じ、各項に適当な作用物質をテーマとして配した。したがって作用物質のスペクトルの各論とはなっていないけれども、作用物質についての多くの問題が吸収スペクトルの解析から巧みに解明されていることを理解していただければ幸である。

2. 吸収の成立・測定・表現

分子がもつエネルギーは、外部エネルギーと内部エネルギーとにわけて考えられる。外部エネルギーは、分子が空間を運動する運動エネルギーによって代表される。内部エネルギーは分子の電子系のエネルギー (E_{elec})、分子をつくっている原子間の振動エネルギー (E_{vib})、分子の回転エネルギー (E_{rot}) から成る。吸収スペクトルに関係するエネルギーはこれら3種の内部エネルギーである。

物質の光吸収を原子構造とむすびつけて考えた最初の人 は N. Bohr である。電子は原子核のまわりを一定の軌道を描いて運動しているから、古典理論に従えば必ず電磁波の輻射がおこらなければならない。なぜならそれは円電流と同じだからである。しかし N. Bohr は電子が一定軌道を描くかぎり輻射はおこらなくて、電子がある軌道から他の軌道へうつるときに輻射がおこるといふ新しい理論 (量子論) をたてた。

それによれば、エネルギーの大きな軌道 n_2 からエネルギーの小さな軌道 n_1 に電子がうつるとき

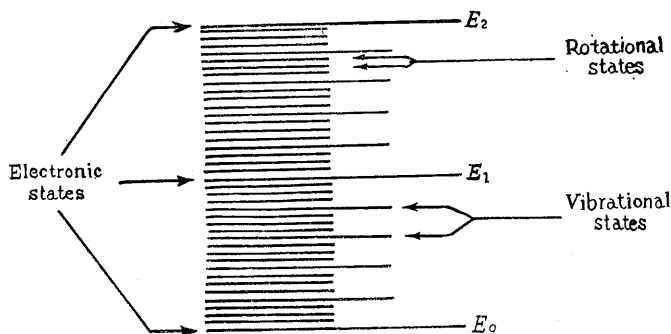
$E_{n_2} - E_{n_1} = h\nu$ (h は Planck の定数で 6.624×10^{-27} erg. sec.) から求められる振動数 ν の光を出し、その逆の移りかわりがあるときは同じ振動数の光を吸収する。

量子論ではさらに電子の描く軌道のエネルギーが、任意の値 (連続値) をとりうるものではなく、量子条件とよばれる規則によって特定の値 (不連続値) だけが許されると考える。水素原子を例にとれば、許されるエネルギー水準は

$$E_n = -\frac{2\pi^2 me^4}{h^2} \cdot \frac{1}{n^2}$$

の $n = 1, 2, 3, 4, \dots$ (以下正整数) に相当するものに限られる。水素原子を適当な物理的方法で刺激してエネルギーの大きい軌道にのせ、つぎにそれがもとの安定したエネルギーの小さい軌道にもどるさいに $(E_{n_2} - E_{n_1})/h$ に等しい振動数の光が放出されるが、 E_{n_2} として許されるエネルギー値がいくつかの不連続値であるために、水素原子から発光されるスペクトルもいくつかの不連続線である。光が吸収される時もまったく同じ原理による。

分子はすくなくとも 2 個以上の原子が化学結合によって結ばれている原子集団であるので、その内部エネルギーには原子にみられるような電子エネルギーのほかに、原子間振動および回転のエネルギーが加わる。これら 3 種のエネルギー水準は (原子の電子エネルギー水準と同じように) 量子化されていて、特定の不連続値しかとることが許されない。第 1 図⁽¹⁾はそのありさまを模式的に描いたものであるが、 E_{elec} のレベルがかなり広い巾 (約 10^5 cal./mole) をへだてているのに対して、 E_{vib} のレベル間隔は狭く (約 10^4 cal./mole)、 E_{rot} はきわめて間隔が狭い (約 10^3 cal./mole)。そこで分子が光からエネルギーを吸収して、低いエネルギーレベルから高いレベルにうつるとき、電子エネルギーが 1 段上昇するには回転エネルギーの約 100 倍のエネルギーが必要である。波長



第 1 図 多原子分子のエネルギー水準

30μ をこえるような赤外線はその光量子エネルギーがきわめて小さいので、回転エネルギーレベルしか上昇できない。分子の電子系エネルギーレベルに影響をあたえるには波長 $2,000 \sim 7,800\text{\AA}$ ($200 \sim 780m\mu$) の紫外線～可視線でなければ

ばならない。これを逆にいえば、種々の波長をふくんだ光（連続光）を分子層にあてたとき、紫外部～可視部にみられる光吸収はその分子の E_{elec} によるものであり、近赤外部の吸収は E_{vib} に、遠赤外部の吸収は E_{rot} によるものである。ただ E_{elec} の変化にさいしては E_{vib} および E_{rot} の変化も同時に伴うので、スペクトル線は微細構造[※]をもつようになる。ことに作用物質の研究は溶液として、かつ室温で測定されることが多いが、溶媒効果と温度効果とによつてスペクトル線群は融合し一定の巾をもった帯スペクトルとなる。

帯スペクトルをあらわすのに、ヨコ軸に波長を、タテ軸に分子吸収係数 ε を目盛った吸収曲線がもちいられる。 ε は Beer 則（後出）からつぎのように定義される

$$\varepsilon = \frac{1}{cd} \log I_0/I$$

c は溶液のモル濃度、 d は液層の厚さ (cm)、 I_0/I は単色光の入射時と透過時の強度の比である。したがって吸収曲線をつくるには、光源からみちびかれた連続光をプリズムにより分光する部分と、 I_0/I を光電流として測定する部分⁽²⁾を必要とする。1941年以後、Beckman DU Spectrophotometer⁽²⁾ によって代表される各種の測定装置がひろくもちいられている。

なお構造が未確定のためモル濃度が算定できないときや、2種以上の混合溶液の吸収を表示するばあい、あるいは同一濃度で吸収を比べるときなどには $\log I_0/I$ を ε の代りに用いる。これを吸光度 (optical density) とよび、通例 D であらわす。

3. 定 量 分 析

A. Beer 則と定量分析

すでにのべたように、それぞれの単色光について Beer 則^{※※}が成立つ。すなわち

※ 1本のスペクトル線を分解能のよい分光器でみると、いくつかの線群から成っていることが分る。これを微細構造という。

$$c = \frac{1}{\epsilon d} \log I_0/I$$

において、 d を一定にとればモル濃度 c と吸光度 $\log I_0/I$ とは比例関係にあるから、後者を測定すれば前者が求められ、いわゆる定量分析が可能である。

しかし色素溶液においてはある程度以上の濃度では Beer 則が精密にはあてはまらないことが知られている。⁽⁴⁾ これは色素分子が2分子会合体をつくるためと考えられている。

B. 2成分系の定量分析

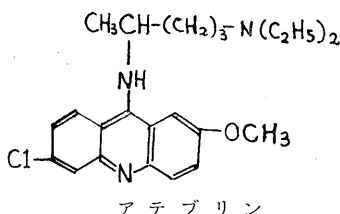
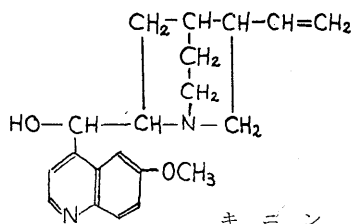
アカネ科 *Cinchona* 属の樹皮はキナ皮とよばれ、マラリアの特効薬^{※※※}キニンをふくんでいるので有名であるが、そのほかキニジン・シンコニン・シンコニジンなどのアルカロイドをもつ。⁽⁵⁾ Grant-Jones の研究によれば、キニン（およびキニジン）は $348m\mu$ に λ_{max} があり、シンコニン（およびシンコニジン）は $316m\mu$ に λ_{max} があるから、両種の混液からそれぞれを分光学的に定量することができる。ただ注意を要する点は両アルカロイドとも第2図にみられるように吸収が $316m\mu \sim 348m\mu$ にわたっているので、つぎの連立式から各成分の濃度を算出しなければならない。

$$D_{316} = x Dq^{316} + y Dc^{316}$$

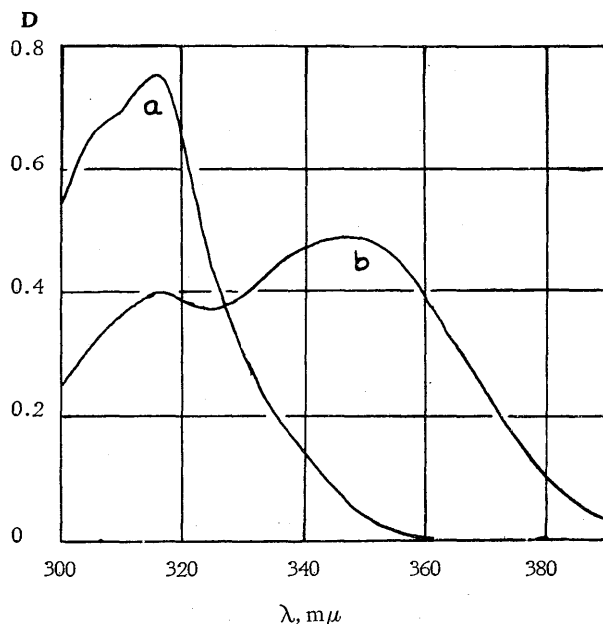
$$D_{348} = x Dq^{348} + y Dc^{348}$$

※※ Lambert, Bouguer, Bunsen, Roscoe の名も附して呼ばれることもあるが、通常光吸収が濃度に比例することをみつけた Beer の名のみで表わされる。⁽³⁾

※※※ マラリアの治療に用いられる合成薬アテブリンはキニンとキノリン核を共有する。



D_{316} は混合溶液の $316m\mu$ の吸光度、 Dq^{316} および Dc^{316} はそれぞれキニンおよびシンコニンだけの標準溶液の $316m\mu$ の吸光度であり、添数 348 を附したのは $348m\mu$ における上記の各量である。



第2図 (a) シンコニン(およびシンコニジン) (b) キニン
(およびキニジン), 濃度はいずれも 30mg/L, 0.1N-HCl中

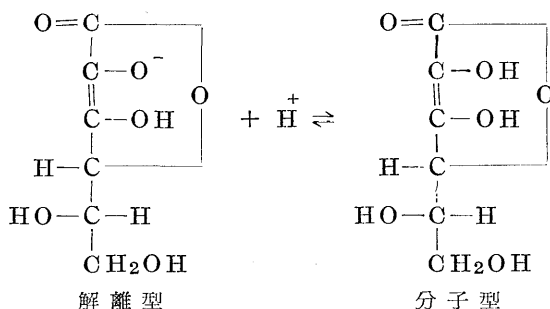
C. 不安定な物質のスペクトル

水溶液 (あるいは有機溶液) にすると、光分解・空気による酸化 (autoxidation) ・加水分解などによって分子構造の変化や分解がおこる物質の吸収スペクトルの測定には、いろいろと対策が必要となる。1例として、ビタミン C (L-アスコルビン酸) をとり上げてみよう。

第1表にみられるように、ビタミン C の紫外吸収スペクトルの吸収値には、多くの研究者たちによってまちまちの数値が与えられている。265 $m\mu$ 吸収帯は中性附近にみられるピークで解離型構造によるものであり、245 $m\mu$ 吸収帯は酸性でみられる分子型構造によるものである。

第 1 表 ビタミン C 水溶液の吸収値 $E \frac{1\%}{1\text{cm}}$

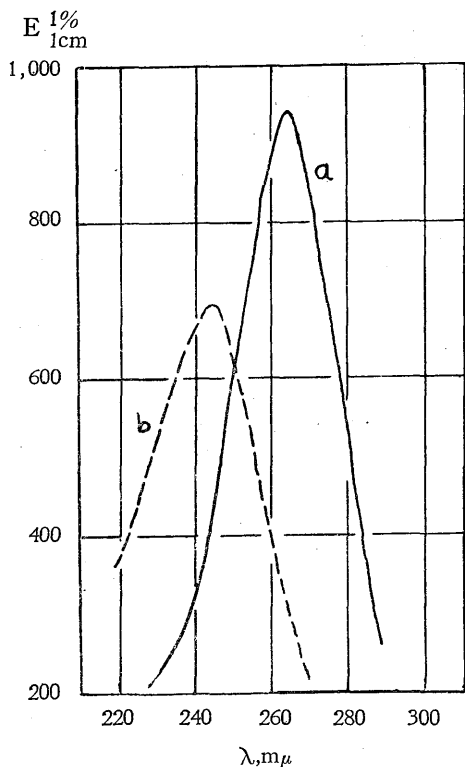
265m μ	245m μ	測定者 (年)
	543	Herbert, R. W., et al. (1933)
540		Chevalier, A., Charon, Y. (1937)
543		Mohler, M., Mohr, H. (1938)
908	798	Carpeni, G.E. (1938)
530	543	Adamson, D.C.M., Evers, N. (1941)
714		Morton, R.A. (1942)
	471	Vestling, C.S., Rebstock, M.C. (1945)
543		Rosenberg, H.R. (1945)
400	688	Hack, M.H. (1947)
	550	Coward, K.H. (1947)
860	525	Daglish, C. (1951)
450	450	Heyns, K., Paulsen, H. (1953)
	560	Garratt, D.C. (1955)
630	550	Lawendel, J.S. (1956)
940	695	Lawendel, J.S. (1957)



これらの数値の不一致はビタミン C 水溶液が不安定なことに原因する。表中のいくつかのデータはシアン化アルカリを加えて分解を防止したり、水溶液から十分空気を除いて嫌氣的条件下で測定されたものである。Lawendel⁽⁶⁾は D-ソルビットおよび EDTA を加えたときのビタミン C の吸収値 $E \frac{1\%}{1\text{cm}}$ として 916 ($\lambda_{\text{max}}=265\text{m}\mu$) と 676 ($\lambda_{\text{max}}=245\text{m}\mu$) という高い値をえたが、これは D-ソルビットあるいは EDTA が溶液中の微量の Cu^{++} をキレートし、ビタ

※ ethylenediaminetetraacetic acid の略、分子中にふまくれる 4 コの COOH 基で $-\text{N} \begin{array}{c} \text{CH}_2 \text{ COO}^- \\ \text{CH}_2 \text{ COO}^- \end{array} \text{Cu}^{++}$ のように金属イオンをキレートする。

ミン C の接触的分解をまもるためと考えられた。そこで Lawendel は、完全に嫌氣的条件下で十分注意して $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ を測定したところ、940 および 695 をえた (第1表と第3図)。この値が現在もっとも正しいとみられる。



第3図

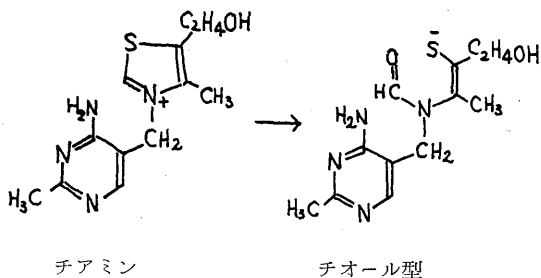
ビタミン C の吸収スペクトル

(a) 解離型 pH6.4

(b) 分子型 pH2.0

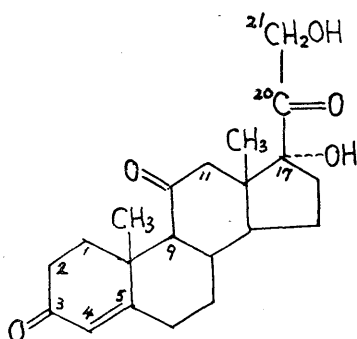
チアミン (ビタミン B₁)

の水溶液は中性では安定であるが、アルカリ性になるとチアゾール環がひらいてチオール型に変化する (第4図 a→b)。



質によって異なることは勿論であるが、なるべく操作がかんたんで発色が安定なこと、そして類似物質との混液から選択的に発色しうるものがよい。比色分析法⁽⁸⁾⁽⁹⁾についてはまとまった参考書があり、とくに作用物質については Hilty⁽¹⁰⁾の綜説があるのでここでは 1, 2 の例を示すにとどめよう。

※
コルチソンはステロイド核をもつ副腎皮質ホルモンの 1 種で、Hench・Kendall らによってリウマチスの特効薬として用いられ有名になった。その定量には、これまで 3 位のケト基による紫外吸収法、20～21 位のケトールのテトラゾリウム試薬による還元法、酸性フェニルヒドラジンによる呈色反応などが用いられたがこれらの方法ではハイドロコルチソンとの区別ができない。⁽¹¹⁾ Schulz らは最近、アルカリ性で 2,6-dibutyl-p-cresol 処理すると、コルチソンは黄褐色 ($\lambda_{\max}=471m\mu$)、ハイドロコルチソンは青色 ($\lambda_{\max}=625m\mu$) に呈色し、可視部の比色定量が選択的になることを明らかにした。



コルチソン

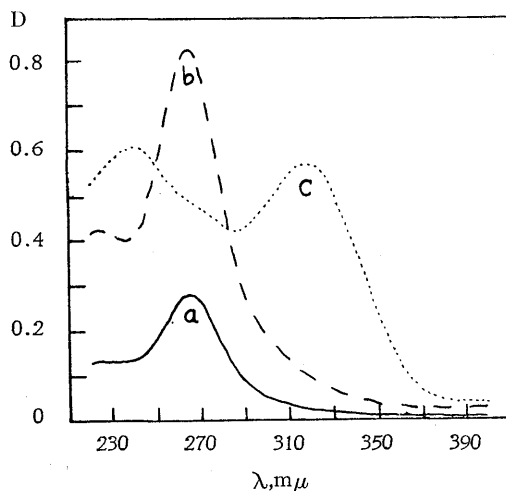
ストレプトマイシン (SM) は紫外部にも著明な吸収がないが、アルカリ性加水分解でマルトールができるので可視部でも紫外部も定量できる。これにたいして、ジヒドロストレプトマイシン (DHSM) はマルトール反応を与えないのでこの方法が用いられない。⁽¹²⁾ Hiscox は酸性で加熱すると第 5 図にみられるように 265m μ にいちじるしいピークを生ずることを利用して DHSM の定量が可能であることを

を明らかにした。すなわち紫外部における発色測定 の例である。

※ ステロイド核をもつ作用物質の種類はかなり多い。たとえば、ビタミン D₂ の前身物質であるエルゴステリン、男性ホルモンおよび女性ホルモン、ジギタリス葉の強心性配糖体、塩類および水の代謝にあずかる副腎皮質ホルモンなど多様である。

0.25N-H₂SO₄中で2時間, 100°C加熱によってえられる溶液の265m μ の吸光度をXとすると、DHSMの量Y(単位は γ /ml)は次式で与えられる。

$$Y = 104.011847X - 0.4236$$

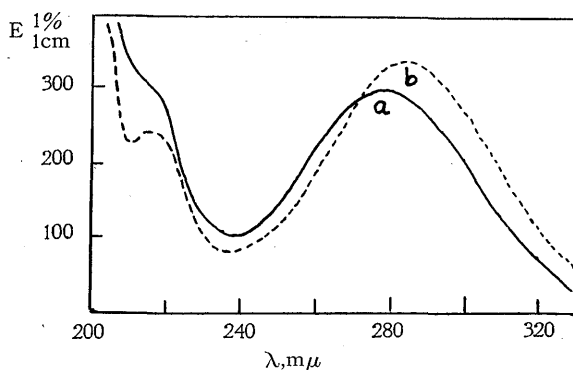


第5図 酸性熱処理したものの吸収スペクトル
(a) DHSM 30 γ /ml (b) DHSM 90 γ /ml
(c) SM 90 γ /ml
【いずれも0.06N-H₂SO₄での測定】

4. 分子構造の研究

A. クロロマイセチン (Chloramphenicol, CMと略す)

CMは Streptomyces venezuela という放線菌がつくる抗生物質でBartzの発見にかかる。毒性少く、グラム陽性、陰性菌やリケッチアに有効である。そ

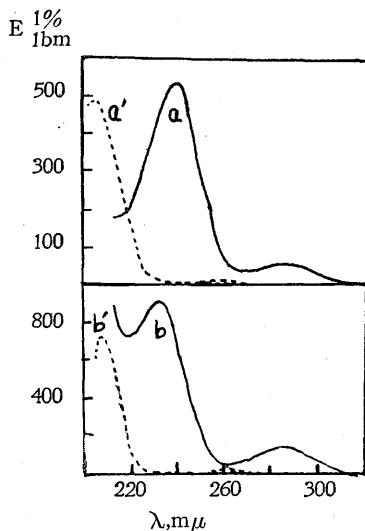


第6図 (a) CM (b) p-ニトロトルエン

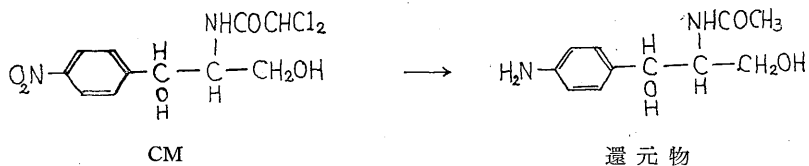
の組成は C₁₁ H₁₂ Cl₂ N₂ O₅ なる中性の化合物で、分子構造は最終的には合成品との一致で確定されたのであるが、紫外吸収スペクトルも重要な寄与をしている。第6図⁽¹³⁾に示すようにCMは278m μ に単一の吸収帯をもつ。

※: げんみつには265m μ と380m μ の吸光度の差を用いる。

Doub-Vandenbelt によるベンゼン置換体の吸収値⁽¹⁴⁾ (第7表)と照合してみると、この 278m μ 吸収帯から、CM がニトロベンゼン系の化合物であることが推定される。天然物質でニトロベンゼン系のもはそれまでないのでこの推定はかなり奇異に感ぜられたが、化学的にその存在が確認された。CM のスペクトルは、とくに p-ニトロトルエンと相似し (第6図)、また CM の還元物質は p-トルイジンのスペクトルとよく対応しているので (第7図) CM につきのような p-ニトロトルエンを主軸とする構造が考えられた。

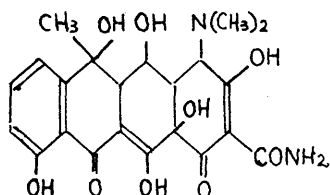


第7図 (a) 還元 CM, 0.1N-NaOH
(a') " 0.1N-HCl
(b) p-トルイジン, pH11
(b') " 0.5N-HCl



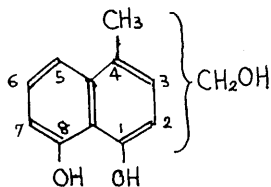
B. テラマイシンの構造⁽¹⁵⁾

Streptomyces rimosus からえられた抗生物質 テラマイシン (TM) は C₂₂H₂₄N₂O₉ なる組成の黄色結晶であってその構造式には

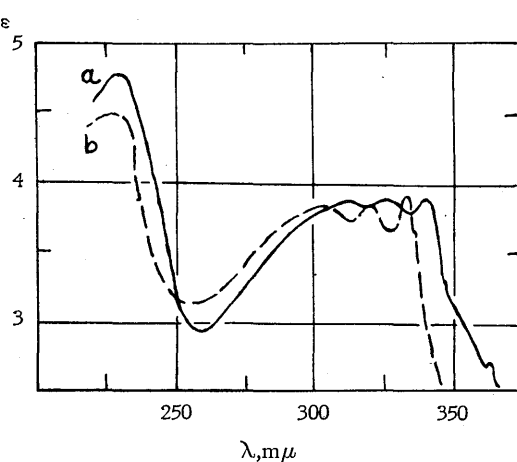
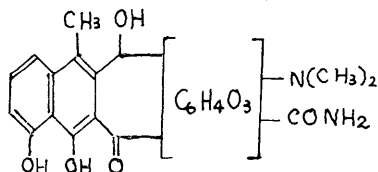


与えられている。この構造決定は主として TM の分解物質の吸収スペクトルを合成品のスペクトルと比較しながら進められたものである。

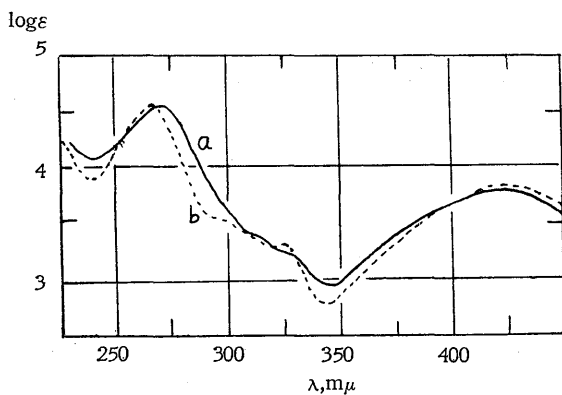
たとえば微量の Zn を加えて TM をアルカリ分解すると、少量のテラナフトールとよばれる弱酸性物質がえられる。このものは第 8 図に示すように 1, 8-naphthalenediol とよく似た吸収スペクトルをもっているのだつぎのような構造と考えられた。



また酸性分解で anhydroterramycin, $C_{22}H_{22}N_2O_8$ がえられ、スペクトルの比較 (第 9 図) からつぎの式が与えられた。



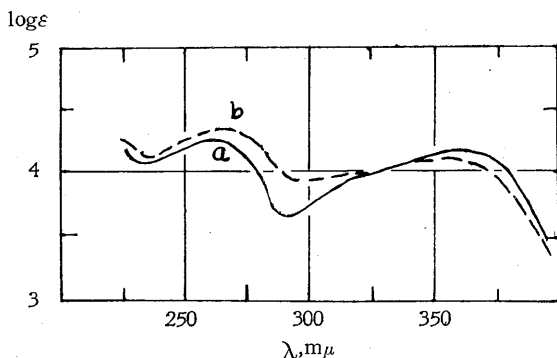
第 8 図 (a) テラナフトール (エタノール)
(b) 1,8-naphthalenediol (エタノール)



第 9 図 (a) anhydroterramycin
(b) 8,9,10-trihydroxy-1-keto-1,2,3,4-tetrahydroanthracene

また TM からメチル基 2 個とれたもの (desdimethylaminoterramycin) は第 10 図のように TM に殆ど近いスペクトル

を示している。前者の構造が確定されたのち、スペクトルの相同から TM に前記のような構造式があたえられた。



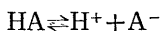
第10図 (a) desdimethylaminoterramycin
(酸性エタノール)
(b) テラマイシン(酸性エタノール)

5. 物理定数の測定

A. pH の測定⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

色素分子に解離性原子団があれば、メジウムの pH の変化につれて色調が変わるのでその変化を分光学的に測定すれば溶液の pH をもとめることができる。

水素イオン活量が $[H^+]$ なる溶液に解離定数 K の弱酸指示薬 (色素) HA を加えると



なる解離に対する平衡から

$$[H^+] = \frac{[HA]}{[A^-]} \cdot K = \frac{m_{HA}}{m_A} \cdot \frac{f_{HA}}{f_A} \cdot K$$

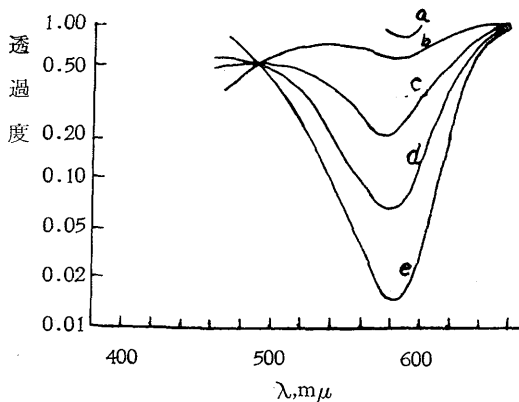
が成立つ (m および f はそれぞれモル濃度および活量係数をあらわす)。

f_{HA}/f_A は近似的に 1 に等しいと考えられるから、上式の両辺の対数を取り負号を乗ずれば

$$pH = \log \frac{m_A}{m_{HA}} + pK$$

がえられる。したがって、あらかじめ指示薬の pK の値がわかっているときは m_A/m_{HA} を分光学的に求めれば溶液の pH を知りうる。

Brode⁽¹⁸⁾ はいろいろの指示薬について、スペクトルの pH 変化をしらべてい



第11図 チモール青吸収スペクトルの pH 変化
 (a) pH 2.6 (b) pH 3.0 (c) pH 3.6
 (d) pH 4.0 (e) pH 5.0

る。第11図はチモール青の例であるが、このように pH 変化に対してスペクトルのピークの高さ（図は透過度をとってあるから谷の深さ）だけが変り、 λ_{max} の変らないものが、1 点波長による光度測定から pH が求められるので好都合である。第 2 表は主な指示薬についての吸収の中心波長である。

第 2 表 pH 指示薬の λ_{max}

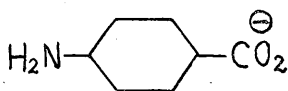
指 示 薬	変 色 域	λ_{max}
Thymolblue	1.2~2.8	544
Bromphenolblue	3.0~4.6	592
Bromcresolgreen	3.8~5.6	617
Methylred	4.4~6.3	530
Bromthymolblue	6.0~7.6	617
Cresolred	7.0~8.8	572
Thymolblue	8.0~9.6	596

タンパク質・アルカロイド・多量の塩類・アルコールなどが共存すると、その pH で示すべき色調と異ったスペクトルを指示薬色素があたえるので、この場合にはガラス電極法によってより正しい値をもとめることが必要である（タンパク質による誤差についてはメタクロマジーの項でふれる）。

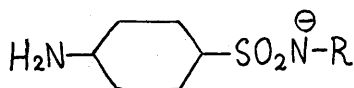
B. pK の測定 (スルホンアミド剤)

プロントジール[※]がブドウ球菌に感染したハツカネズミに対して卓効のあることが G. Domagk により1935年にみつけれ、以来約20年の間にスルホンアミド剤 (S A 剤) の研究は数千種にも達している。サルファピリジン・サルファチアゾール (S T)・サルファダイアジン (S D) などが細菌感染に対する治療剤としてよく用いられる。

SA剤の作用機序は細菌発育素パラアミノ安息香酸 (PABA) をおしのけるといふ代謝拮抗説が一般にみとめられている。PABA は pKa が 4.68 であるから、生理的 pH すなわち pH 7 においては殆んど負イオンとして存在する。SA 剤の pKa は置換基 R の電子論的性質により決まり、pKa が小さいほど生理的 pH における負イオン%は増大する。(Rの電氣的陰性が強いほど N 原子の電子が R に移行するので H 原子は解離し易くなる。つまり $-\text{SO}_2\text{NHR}$ (分子型) から $-\text{SO}_2\text{NR}^-$ (負イオン型) になり易い。これは pKa 値が小さくなることを意味する)。



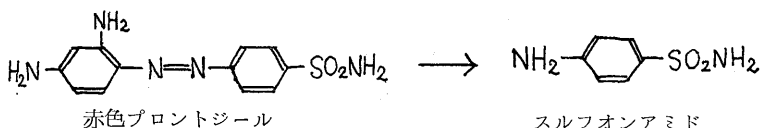
PABAの負イオン型



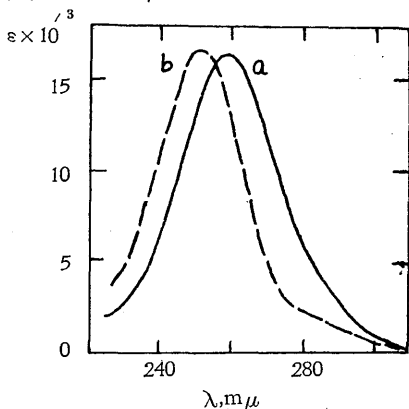
SA剤の負イオン型

SA 剤が PABA を押しのかけて細菌の酵素タンパク質と結合するためには、その分子構造とくに電荷の分布が PABA にできるだけ近似することが望まれるので、⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ 酸としての解離定数の測定はきわめて重要な意味をもつ。^{※※}

※ プロントジールは生体で還元され、スルホンアミドを生ずる。細菌に対して有効なのはこれである。



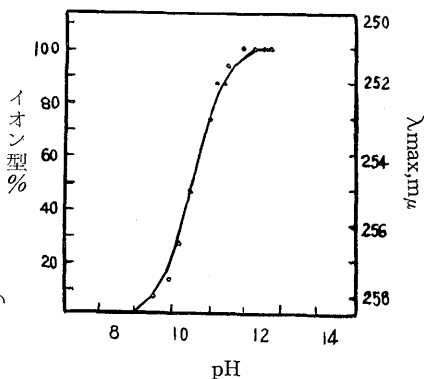
SA の紫外吸収スペクトルは第12図のように中性水溶液で $258\text{m}\mu$ に吸収極大をしめす。溶液をアルカリ性になると、極大は漸次短波長の方へ移動する。この変化は pH がまずにつれて分子型が負イオン型に変つて行くためであつて、極限值 $251\text{m}\mu$ が純粹の負イオン型の吸収極大と考えられる。



第12図 SAの吸収スペクトル
(a) 中性 (b) アルカリ性

線上にのっているが、このことから逆に SA の pK_a 値が 10.59 であることを知りうる。

第13図 SAの酸としての解離曲線
○印は実測した λ_{max} の値、
曲線は $\text{pK}_a=10.59$ として描いた理論線



※※ SA 剤分子型を AH 、イオン型を A^- であらわすと解離反応は次式になる。

$\text{AH} \rightleftharpoons \text{A}^- + \text{H}^+$ この反応の平衡定数、すなわち解離定数 K_a は

$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{AH}]}$ で定義されるが、通常その逆数の対数 pK_a であらわす。

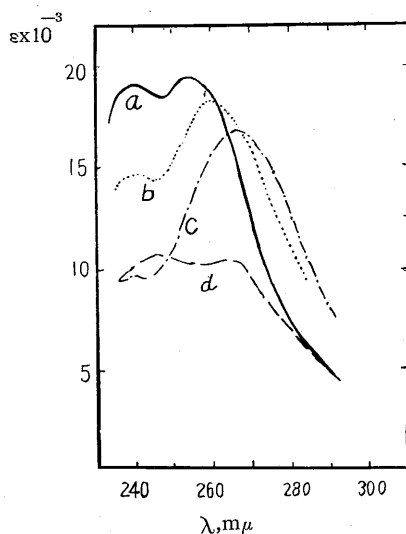
※※※ AH なる分子が H^+ を放つて A^- になるときの解離定数を K 、そのときの溶液の水素イオン濃度を pH とすると $\text{pK} = \text{pH} + \log [\text{AH}] / [\text{A}^-]$

このようにして求めた pK_a の値を、Bell-Roblin の電圧滴定法による値と比較すると第3表のようによく一致する。(pK_b は塩基としての解離定数で、これもよく一致しているがここでは省略する)。同じようにしてアセトス

第3表 SA剤の解離定数の比較

SA剤	解離定数	吸収スペクトル法	電圧滴定法
SA	pK_a	10.59	10.43
	pK_b	11.90	11.64
AcSA	pK_a	5.32	5.38
	pK_b	12.60	12.22
SD	pK_a	6.25	6.48
	pK_b	11.62	12.00
PABA	pK_a	—	4.68
	pK_b	—	2.6

ルファミン (AcSA) およびスルファダイアジン (SD) の pK_a を求めることができる。ただ SD の場合、その吸収スペクトル (第14図) には2つの吸収帯

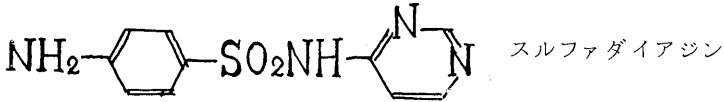


第14図 SDの吸収スペクトル

- (a) pH 8.00 (b) pH 6.20
(c) pH 4.56 (d) pH 2.00

($\lambda_{max}=240m\mu$ と $\lambda_{max}=256m\mu$)
 があって、 λ_{240} の方は pH が減するとともに ϵ は減少するが λ_{max} は変らない。 λ_{256} の方は pH の減少とともに ϵ および λ_{max} とも変化する。Robinson-Pekrul は λ_{240} の ϵ -pH 曲線から pK_a 値を算出し 6.25 をえている。また λ_{256} 吸収帯の pH 変化からも同じ値がえられる。 λ_{240} 吸収帯は Vandenbelt-Doub⁽²¹⁾ および山辺⁽²³⁾ によってピリミジン部分の吸収によることが明らかにされている。この λ_{240} 吸収帯が λ_{256} 吸収帯と本質的には

まったく同じ pH 変化をし、等しい pKa 値を与えることは、ピリミジン部



分による吸収にも $\text{SO}_2 \text{NH}$ 部分の解離がいちぢるしい影響を及ぼすものであることを示している。

C. 酸化還元電位の測定⁽²⁴⁾

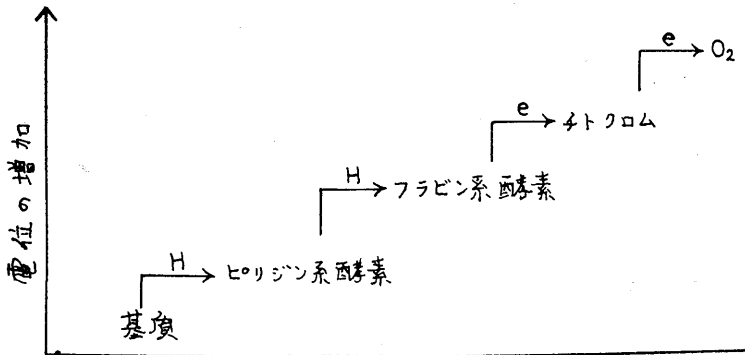
ある与えられた系の酸化還元電位（以下電位とかく）を測定するには、水素電極を相手極として電池をつくりその電位差をポテンシオメーターではかる。電位の式は

$$E_h = E_o + \frac{RT}{nF} \ln [\text{Ox}] / [\text{Red}]$$

で与えられるが、式中 $[\text{Ox}]$ と $[\text{Red}]$ とはそれぞれ系の酸化型と還元型の濃度、あるいはもっと正確に言えば活量をしめす。温度を 30°C にとり常用対数に直すと2電子還元型の電位は

$$E_h = E_o + 0.03 \log [\text{Ox}] / [\text{Red}]$$

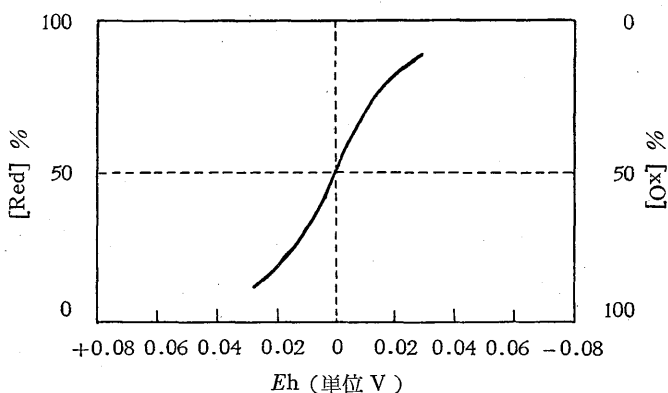
となる。この式は Henderson-Hasselbalch の式とよく似ていて、pKa が酸としての強さの目安となったように、 E_o （標準酸化還元電位）は系の酸化還元能



第15図 呼吸酵素系と電位との関係⁽²⁵⁾

の尺度となり、反応の起る方向と程度を知るのに役立つ。一般に電位の高い系の酸化型は、電位の低い系の還元型から水素または電子をもらう。たとえば、われわれが摂取した食物（炭水化物・脂質・タンパク質）は基質として体内の酵素系にのせられ、第15図の順に酸化（脱水素・脱電子）されて、さいごの受容体である O_2 へ送られる。

電位は正確には電氣的に求められるが、色素を用いてもかなり正しく測定できる。たとえばメチレン青（MB）を測定しようとする系にわずかに加えると、系の電位を乱すことなく MB は系の電位に支配された平衡 $MB \rightleftharpoons HMB$ になる。還元型 HMB は無色であるので平衡時の比色測定から $[MB]/[HMB]$ の値を知ることができる。これを上記の電位の式にいい、 E_o^* を数表から引用すれば系の電位をもとめることができる。第16図は E_o が 0.0volt (pH7.0 の MB がほぼこれに等しい) の指示薬色素の $[Ox]\%$ または $[Red]\%$ と系の電位との関係である。



第16図

第4表は酵素の電位の値を Theorell-Bonnichsen⁽²⁵⁾ の論文から選んだものである。

※ E_o は標準状態、すなわち pH=0 で測定されたものである。生化学的には中性付近で系の電位を比較するばあいが多い。pH=0 以外の点で測定した値を E' であらわす。普通は pH=7.0 の値が用いられる。

第4表 酵 素 の 電 位

系	E'o(単位は volt)
チトクロム b	-0.04
旧黄色酵素	-0.06
遊離のリボフラビン	-0.185
アルコール脱水素酵素・DPNH	-0.21
DPNH	-0.28

6. メタクロマジー

A. 現象と理論

メタクロマジーとは色素が物質と結合し色調の変化（もっと正確には吸収スペクトルの変化）を生ずる現象で、ドイツの細菌化学者 P. Ehrlich のはじめて用いた語である。細胞にこのような物質（メタクロマジー活性体）があると、その部分が本来の色調と異って染められることが組織染色に利用されてきた。

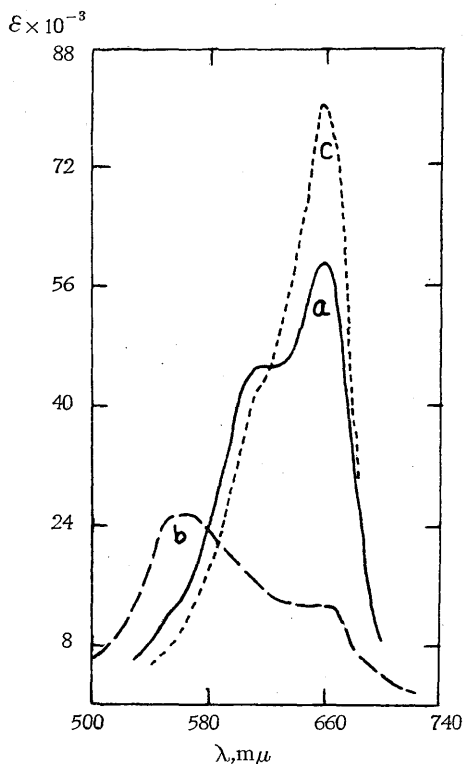
メタクロマジー活性体は高分子性の電解質であって、例えば核酸やポリヴィニルアルコール硫酸エステル K 塩 (PVSK) がよく用いられる。色素がこれらの活性体と結合したときの分子状態の変化から、メタクロマジーを説明しようとする試みがいくつかなされている。色素と高分子との結合にかぎらず、基質が酵素タンパク質と結合し、薬剤分子が細胞と結合するときにもメタクロマジーと同じ、あるいはよく似たメカニズムがはたらいていると考えられるので、この研究はきわめて有用である。

Michaelis-Granick の理論⁽²⁷⁾

メタクロマジーは Beer 則に従わない色素に著しいので、色素分子の会合との関係が考えられる。第17図にその例がみられるように、色素 MB 水溶液の吸収極大はその濃度の増すにつれて短波長の方へずれる。これは色素の2分子会合体 (dimer) の吸収によると考えられている。

※ 寒天を色素水溶液に加えると吸収極大はさらに短波長の方へずれ、青色光

※ 主成分はガラクトン（加水分解するとガラクトースを生ずるセルロース様物質）の硫酸エステルであり、したがって酸性高分子である。



第17図 MBのメタクロマジー

(a) MB $1.27 \times 10^{-4} \text{M}$ (b) MB $1.27 \times 10^{-4} \text{M}$
に1.8%寒天を加えたもの (c) MB $6.35 \times 10^{-6} \text{M}$

を吸収するので色調は赤紫色になる。これは2分子よりも会合度の高い色素 aggregateが寒天分子に吸着していると説明される。なお核酸を加えたときのスペクトル変化はわずかであった。したがって、核酸との結合には色素会合体がつくられていない。

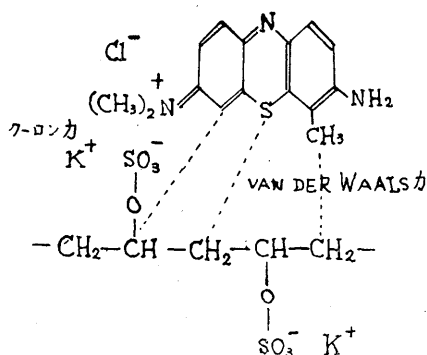
寺山の理論⁽²⁸⁾

メタクロマジーにあずかる力は第18図に示すように、色素の正荷電と高分子の酸性基の負荷電との間にはたらくクーロン力(イオン結合)と、色素分子と高分子間にはたらく van der Waals 力および水素結合の3種である。メタクロマジーの強さ、すなわち色調の変化の度に

もっとも影響を与えるものはクーロン力であり、一般的に PVSK などの SO_3^- 基が PO_4^- 基や COO^- 基より強いメタクロマジーをおこす。

なお寺山博士が著者に語られたところによると、高分子の酸性原子団が PVSK にみられるように、一定の近距離をにおいて多数配列されていることがメタクロマジー活性に必要な条件である。色素分子が高分子の酸性原子団と結合しても、分子熱運動によってその結合はしばしば破られるが、近距離に酸性原子団があれば直ちにそれと結合することができ、統計的にみればいつも一定率の結合が確保されていることになるからである。

(NH₄)₂ SO₄ のよ
うな低分子電解質を加
えたばあいには、きわ
めて高濃度でわずかに
吸収スペクトルの変化
がみとめられるにすぎ
ない。これは分子量の
小さいことと、統計的
な因子に缺けているこ
とによるといえる。



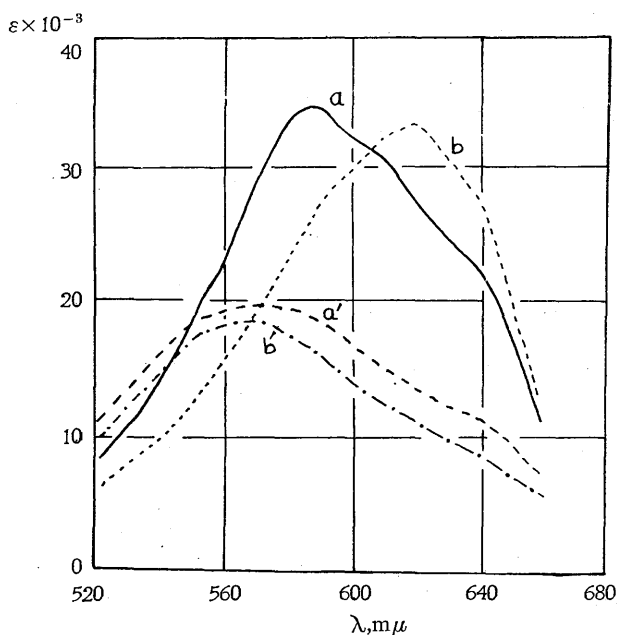
第18図 TB と PVS の結合モデル

色素分子が第18図に示されるような機序によって高分子と結合すると、色素分子の量子力学的共鳴が阻害されるようになり吸収極大が短波長側へずれる。

Weissman らの研究⁽²⁹⁾

リボ核酸 (RNA) およびデオキシリボ核酸 (DNA) による トルイジン青 (TB) のメタクロマジーはかなり条件が揃わないとみられない。すなわち pH 6~7, 温度30°C 以下, イオン強度 0.03以下, 色素と核酸の P とのモル比が 0.4~1.4 になるとき、いちじるしいメタクロマジー (青→紫) がみられる (第19図)。メタクロマジーには2種の結合が関与する。その1つは、核酸の PO₄⁻ と TB の N⁺(CH₃)₂ の間のイオン結合である。pH および イオン強度がこの結合に影響するが、この結合だけでは γ-ピークとよばれる 540mμ の吸収帯は生れない。イオン結合が成立すると van der Waals 力による無極性結合が色素分子間にはたらい、色素分子間の会合 (polymerization) が成立する。このとき色調のいちじるしい変化がみられる。もし核酸が色素に比べて多いと少数の色素分子がデタラメにイオン結合をつくり、分子間隔があきすぎて会合ができない。Michaelis はこのような条件でスペクトルをしらべている

※ 電解質溶液にふくまれる数種のイオンのうち、i 種のイオンの濃度を V_i、イオンの価数を Z_i としたとき、 $\frac{1}{2} \sum V_i Z_i^2$ をイオン強度という。



第19図 TBのDNAによるメタクロマジー

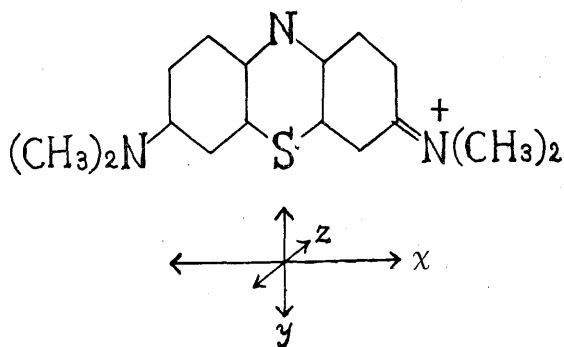
(a) TB $4.06 \times 10^{-5} \text{M}$ (b) $5.10 \times 10^{-6} \text{M}$
 (a') は (a) にDNAを加えたもの(モル比は1.35)
 (b') は (b) にDNAを加えたもの(モル比は1.35)

わけである。この第2の結合には、そのほか温度・溶媒の種類が大きい影響をおよぼす。

山辺の理論^{(30)※}

メタクロマジーが色素の色調変化にある以上、発色の機構⁽³¹⁾と助色団の意義⁽³²⁾とに結びつけなければならぬ。色素分子の3次元構造に対して、電子系の

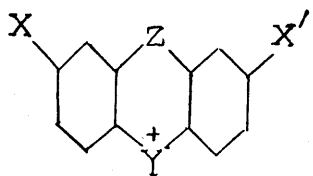
振動も3方向に考えられる。例えばメチレン青(MB)ではアミノNの正荷電



※ メタクロマジーの研究に御指導をいただいた東京大学理学部 寺山 宏博士に感謝の意を表します。

が右から左へ、左から右へと共鳴構造に対応して移動し x 軸振動となる。[※]

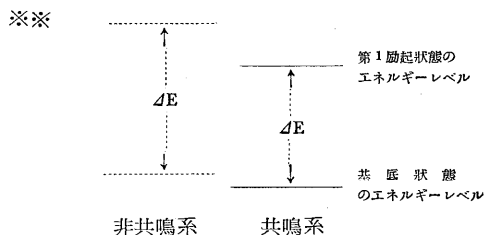
イオン型間の共鳴、または荷電の分離をふくむ構造間の共鳴が大きいほど第1励起エネルギーレベルが低くなり、^{※※}したがって励起に必要なエネルギーは少なくてすむ、これは吸収光の波長が長くてよいことを意味する。また Lewis⁽³³⁾はつぎのような一般式であらわされる色素において、原子団 X・X'・Y・Z



と色素の x 軸振動との関係をしらべ、助色団 X および X' のもつ正荷電が大きいほど λ_{\max} は大きくなることを明らかにした。したがって $\text{OH} < \text{OR} < \text{O} < \text{NH}_2$ or NR_2 の順に λ_{\max} は長波長へうつる。

さて MB が PVS₂K とメタクロマジーをおいこす場合を考えてみよう。MB の $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ が PVS₂K の SO_3^- とイオン結合するために、(i) MB の正荷電がアミノ N 原子間を振動することがいちじるしく制限される。これは寺山理論における共鳴の阻害に他ならない。したがってエネルギーレベルが非共鳴系に近ずき ΔE が大きくなって吸収光の波長は短波長へ動く、(ii) MB の正電荷が量的に減少し、^{※※※} Lewis の規則によって λ_{\max} は小さくなる。この (i) および (ii) の効果から、 λ_{\max} は短波長へ移ることになる。

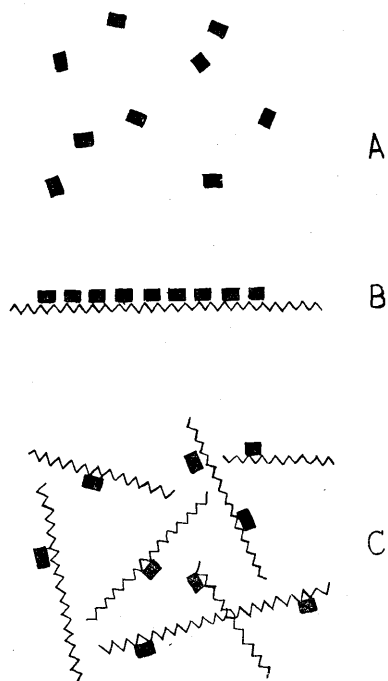
※ 振動面が色素平面内にあって、分子の長軸方向の振動を x 軸振動という。これにたいして、短軸方向の振動を y 軸振動、色素平面に直角方向のを z 軸振動という。プソイドイソシアニンについては $530\text{m}\mu$ が x 軸、 $490\text{m}\mu$ が y 軸、 $573\text{m}\mu$ が z 軸振動である。濃度の低いところでは分子が会合せず、したがって z 軸振動による吸収はみられない。



※※※ 次頁

イオン結合により色素分子が高分子の長軸に沿って固定されると(第20図B)、色素分子間の相互作用力により多分子会合が成立する。単なる会合と異なるのはその規則性とイオン結合による x 軸振動の固定がはるかに強いことである。

高分子濃度をさらに増すとメタクロマジーは逆行し、遊離型の色調にもどる。これは第20図Cのように高分子1個に結合する色素分子数が減少し、色素の分布状態がちょうどたんなる色素水溶液(第20図A)に近づくためにおこる。即ち色素分子間の非イオン性の結合は成立しなくなって分子会合が解かれると共に、1個の色素分子は数個の高分子よりクーロン引力をうけるため、各方向について平等な電場におかれたことになってx軸振動は再び自由になる。したがってスペクトルは遊離型のものにもどることになると考えられる。



第20図 色素イオン(黒印)と高分子の結合状態

(A) 色素のみ (B) 色素会合状態
(C) 高分子の比率が高い場合

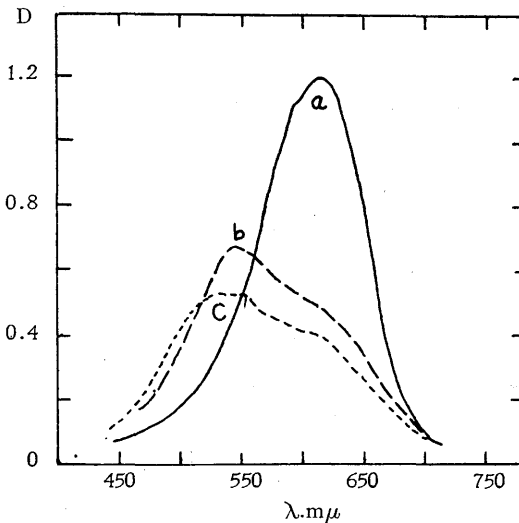
※※※ メタクロマジーが十分おこると、PVS_Kの安定性はいちじるしく減少し沈澱を生じまた粘度も減少する。これは水分子をひきつけていたPVS_Kの負イオン荷電が色素の正荷電により中和されたことによる。

〔附〕 ヘパリンによるメタクロマジー

核酸のほかに、メタクロマジー活性物質としてコンドロイチン硫酸・ムコイチン硫酸・ヒアルuron酸・ヘパリンなどがある。これらはいずれもその酸性原子団によって色素と結合しメタクロマジーをおこす。ヘパリンあるいはヘパリン様物質は血液凝固阻止作用を示すが、Heilbrunn⁽³⁴⁾らは癌細胞にたいする抑制効果に注目している。卵および卵巣にメタクロマジー活性物質があるが、Kelly⁽³⁵⁾はそれがヘパリン様物質であり、細胞成分として存する塩基性タンパク質はその活性を阻害することを明らかにした。

一般に、動物の卵巣抽出液は癌の抑制に有効であり、血液凝固阻止作用もちじめるしく、ヘパリンとよく相似する。

第21図は TB の うすい水溶液に 2 種の メタクロマジー活性物質を加えたとき

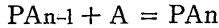
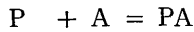


きのメタクロマジーである。620m μ の吸収帯が弱まり、代って540m μ に新しい吸収帯がみられる。chick embryo抽出液がヘパリンと同じように活性であることがよく示されている。なおプロタミン（塩基性タンパク質）を加える、これがヘパリンとつよく結合するため TBのスペクトルは遊離型にもどる。

第21図 (a) TBのみ (b) chick embryo液1.0mg%加えたもの (c) ヘパリン1.0mg%加えたもの

B. 色素とタンパク質の結合量論⁽³⁶⁾

A を色素負イオン、P をタンパク質分子とすると、つぎのような連立平衡式が成立つ。



n は 1 個のタンパク質分子が結合しうる負イオンの最大数である。各平衡式における平衡定数 K_i は

$$\frac{(PA_i)}{(PA_{i-1})(A)} = K_i$$

である。一般に K_i は i の値 (1 から n まで) によってこととなるが、その平均的なものを K と考え、各負イオンが等しい K でタンパク質分子に結合しているとする

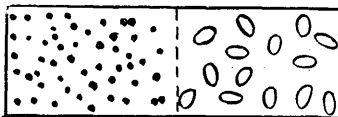
$$K_i = \frac{n-(i-1)}{i} \frac{1}{K}$$

が理論的にみちびかれる。この K を用いれば、色素濃度が (A) になるとき、全タンパク質分子に結合する色素分子数の比 r は

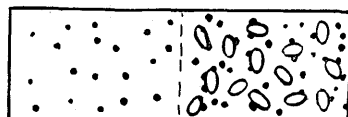
$$\frac{1}{r} = \frac{K}{n} \frac{1}{(A)} - \frac{1}{n}$$

であたえられる。そこで平衡透析法[※]によって、種々の濃度の色素に対する r の値を比色定量からもとめ、 $1/r$ をタテ軸に、 $1/(A)$ をヨコ軸にとれば直線の勾配から K/n を、タテ軸の切片から $1/n$ を出すことができる。このようにして n および K の値が算定される。

※ 図の(I)のように透析用セルをセロファン膜(半透膜)で2分し、左に色素溶液、右にタンパク質溶液を入れる。平衡成立後(II)左の色素の濃度を比色定量すれば、それは右の遊離色素の濃度に等しく、全量からこの両者を差引いたものがタンパク質に結合していることになる。ただしセロファン膜への吸着および Donnan 効果を考慮しなければならない。



(I)



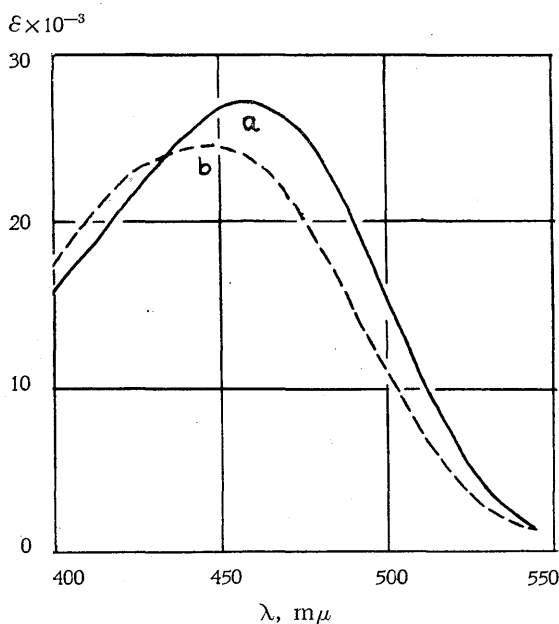
(II)

メチルオレンジ (MO) のウシ血清アルブミンに対する平衡透析の実測点を通る直線は

$$\frac{1}{r} = \frac{4.48 \times 10^{-4}}{22.4} \frac{1}{(A)} + \frac{1}{22.4}$$

であらわされるから、誤差を考えると n の値は 22 とみられる。また、 $K = 44.8 \times 10^{-4}$ から K_1 をもとめると 4.9×10^4 となり $\Delta F_1 = -RT \log K_1$ に代入すると $-5,960 \text{ cal./mole}$ を得る。⁽³⁷⁾ これは MO がタンパク質分子にはじめて結合するときの遊離エネルギーの変化量である。

MO は酸性で赤色、アルカリ性で黄色を呈するのでよく pH 指示薬として用いられる。アルカリ性色の吸収スペクトルは第22図にみられるように $460\text{m}\mu$ に λ_{max} がある。いまこれにウシ血清アルブミンを適当量加えると ϵ の減少とともに λ_{max} が $440\text{m}\mu$ にうつる。このスペクトル変化は色素イオンがタンパク質分子のある特定の原子団 (後述する) と複合体をつくるためである



第22図 MOのスペクトルにおよぼすアルブミンの効果
(a) MO のみ (b)ウシ血清アルブミンを加えたもの

第5表タンパク質との結合による色素の λ_{\max} の移動の比較[※]

色 素	λ_{\max} (対照)	λ_{\max} (タンパク質添加)
MO	460	440
Orange I	473	473
Orange II	481	481
Azosulfathiazole	495	505
Amaranth	514	524

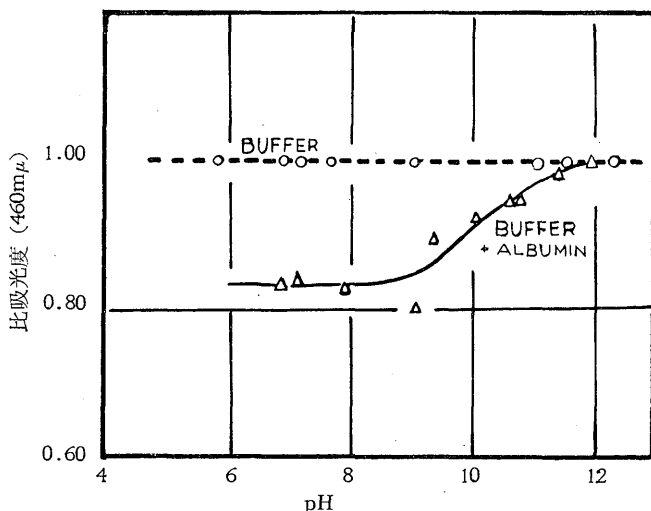
※ タンパク質としてウシ血清アルブミンを用い、色素はすべて SO_3^- 基をもったアゾベンゼンまたはアゾナフタレン系のものである。

が、色素の基底状態（量子数のもっとも小さいもの）と励起状態のエネルギー水準におよぼすタンパク質の結合効果は、たんに結合にあずかる SO_3^- 基の性質だけでなく分子全体の性質によって影響されると考えられる。なぜなら、おなじように SO_3^- 基をもつ色素であっても第5表に示すようにタンパク質と結合したときの λ_{\max} の移動方向が必ずしも短波長側にかぎられていないからである。

Klotz は MO-タンパク質 結合には色素の会合およびミセル説を否定している。それは、MO の濃度が Beer 則によく合う領域であること、タンパク質濃度のほとんど5倍の dodecyl sulfate を用いても、タンパク質を加えたときのようなスペクトル変化がえられなかったことから明らかであるという。

さて色素の側の結合による変化は明らかにされたが、この色素はタンパク質のどの部分と結合するのであろうか。例えば MO のタンパク質結合によるスペクトル変化のうち、 ϵ の変化を pH に対してとると第23図のような実測曲線がえられる。

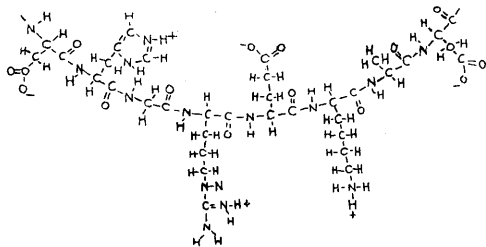
緩衝液 (buffer) だけでは pH による ϵ の変化はみられないが、タンパク質が存在すると ϵ はかなり減少する (pH 6~8 で約17%)。しかしこの変化は pH 9 をこえると次第に小さくなり pH12 に至ると、ほぼ緩衝液の値と一致する。これはタンパク質との結合が pH の高いところで消失することを考え



第23図 MO の ϵ (460m μ) \sim pH 曲線におよぼすアルブミンの影響

※ させるが、このことは実際に限外濾過によってたしかめられている。

色素負イオンとタンパク質との結合のつよさ、もっと定量的に言えば結合定数 K の値を決定する因子は静電引力と van der Waals 力であり、静電引力の基礎になるものはタンパク質分子のアミノ酸組成である (第24図)。タンパク質の等電点は大体 pH 5 であるから、pH 6 以上では分子全体としての荷電はマイナスである。しかしタンパク質の構成アミノ酸には第6表のように塩



第24図 タンパク質のアミノ酸組成 (1部分)

基性のものがあり、たとえばリジンの ϵ -アンモニウム基^{※※}の正荷電が MO の負荷電をひきつけている。このような塩基性原子団もその解離点をこえると正荷電を失うが、それに伴って MO

※ 濾紙の代りに半透膜を用い、タンパク質などのコロイド溶液を吸引・加圧によって速かに濾過すること。平衡透析法が用いられないのは長時間を要するため、高い pH ではタンパク質が変性するからである。

※※ 次頁

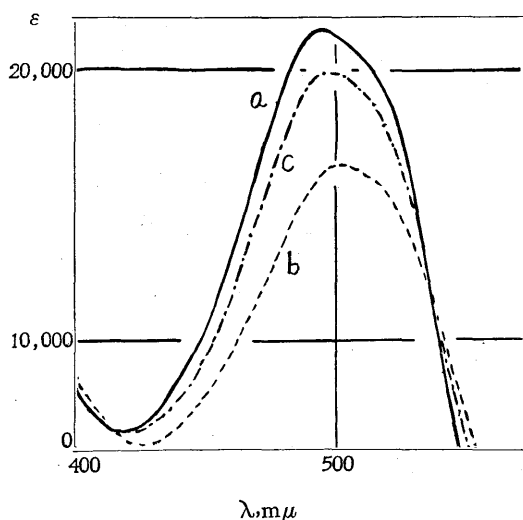
第6表 タンパク質の塩基性原子団の解離定数 (25°C)

アミノ酸	塩基性原子団	pK
ヒスチジン	イミダゾール	5.6~7.0
リジン	ϵ -アミノウム	9.4~10.6
アルギニン	グアニジン	11.6~12.6

に対する結合性も失われている。

C. 有機負イオンとタンパク質の結合⁽³⁸⁾

MO などの色素がタンパク質と結合するとそのスペクトルに変化がみられるが、さらに有機負イオンを加えるとスペクトルは遊離型へもどる。これは有機

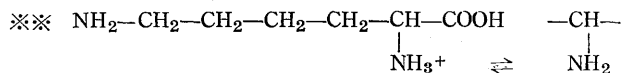


第25図 アソスルファチアゾールの吸収スペクトル
(a) 色素のみ (b) ウシ血清アルブミンを加えたもの
(c) さらにフタル酸水素カリウムを加えたもの

負イオンが色素イオンをおしのけてタンパク質のN⁺部分と結合するためと考えられる。

第25図はアゾスルファチアゾールを用いて、有機酸イオンがどの位色素のスペクトルを遊離型にもどすかを示している。

多くの有機酸についてしらべられたところによると、クロル安息香酸・サリシル酸・マレイン酸・フタル酸



pK に相当する pH、すなわち9.4~10.6まで左型で、それをすぎると正荷電を失って右型にうつる。

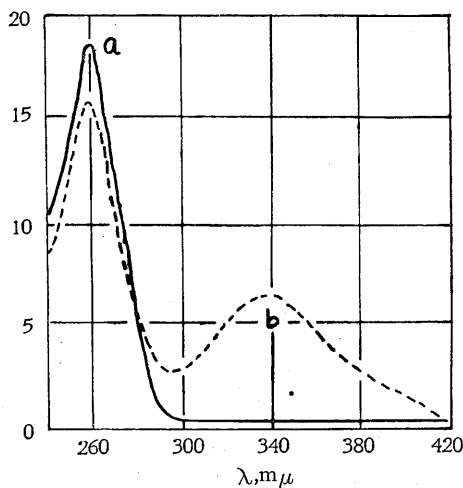
などのイオンが、タンパク質と強く結合することが明らかにされている。

7. 作用機構へのつながり

A. 酵素反応速度論

脱水素酵素は一般に、作用団とよばれる低分子部分とアポ酵素（タンパク質）とからなる。フラビン系作用団をもつ酵素にアミノ酸脱水素酵素・キサンチン脱水素酵素などがあり、ピリジン系作用団をもつものにアルコール脱水素酵素・グルタミン酸脱水素酵素などがある。これらの酵素反応の研究に、MBのような色素の利用と、ピリジヌクレオチド DPN^{+} が還元され DPNH になると $340\text{m}\mu$ に吸収が生ずるので（第26図⁽³⁹⁾）分光分析により追う方法とが大いに寄与している。

$\epsilon \times 10^{-3}$



第26図 (a) DPN^{+} (b) DPNH

反応速度は基質濃度 $[S]$ と

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

なる関係にあるから、分光学的方法によって v を測定すれば $1/v \sim 1/[S]$ のグラフから最大速度 V および Michaelis 定数 K_m をもとめることができる。この K_m の逆数値は基質と酵素の結合の親和性の尺度となるもので、酵素科学の定数の中でもっとも基本的なものである。

B. 作用団とタンパク質の結合

Theorell と Bonnichsen は DPNH のスペクトルがアルコール脱水素酵素 (ADH) を加えると変ることをみつけた。第27図に示すように DPNH の $340\text{m}\mu$ 吸収帯はADHのタンパク質部分と結合して短波長に移行する。最大のスペ

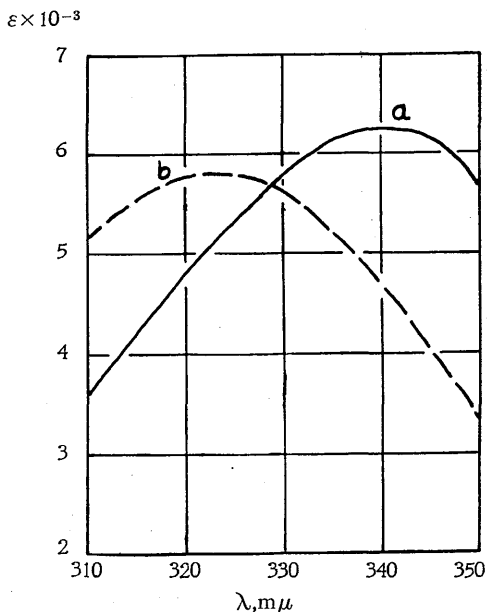
クトルのずれは $\text{ADH} \cdot (\text{DPNH})_2$ のところでえられる。この複合体は SH 基試薬である PCMB を加えると分解され、スペクトルが $340\text{m}\mu$ にもどる。 $340\text{m}\mu$ 吸収帯はピリジン核の還元によっておこるのであるから、Theorell-Bonnichsen は酵素の SH 基が DPNH のピリジン核と結合しているものと考えている。Theorell-Chance はこの複合体が解離定数 10^7M の、本当の Michaelis 中間体であることを反応速度論的に証明した。

C. 基質—酵素複合体

酵素反応の速度論研究において、Michaelis-Menten は基質と酵素が中間複合体をつくるという理論をたてている。しかしこのような複合体は一般にきわめて不安定でそれを取りだして有機化学分析にかけることはできないので、溶液中でなんらかの物理化学的方法を用いて研究しなければならない。

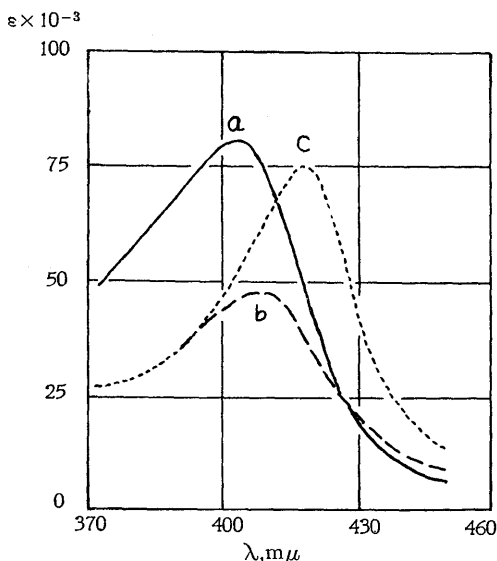
(40)(41)

Chance は特別の装置をつかってこのような複合体のスペクトルをとるのに成功した。第28図はワサビペルオキシダーゼの



第27図 (a) 遊離DPNH (b) アルコール脱水素酵素タンパク質を加えたもの

Soret 帯 (a) および H_2O_2 との複合体 (b), (c) である。酵素作用のない鉄ポルフィリンタンパク質 (例えばヘモグロビン) では複合体 (b) が生じないことは重要である。(c) は (b) から 2 次的にできるものであらうと考えられている。これらの複合体の構造は良く判らないが、Soret 帯の吸収が減少するのはテトラピロール核の開裂か、ヘムがタンパク質からはなれるためと推定される。

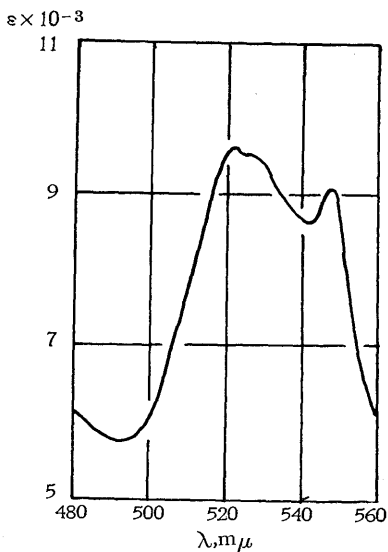


第28図 (a) ワサビペルオキシダーゼのSoret帯
(b) および (c) は H_2O_2 との複合体
のスペクトル

テインがチトクロム c を還元することからペニシリン自体は還元能はないけれどもその分解物質たとえばペニシラミン・ペニシレン酸などがチトクロム c を還元する可能性のあることが考えられる。

ペニシリン G を pH 4.7 で $100^\circ C$, 15分加熱し(このものは $\lambda_{max}=322m\mu$ で、ペニシレン酸は $\lambda_{max}=320m\mu$ で

第29図 ペニシリンGを加えたチトクロムの吸収スペクトル (pH7.0)

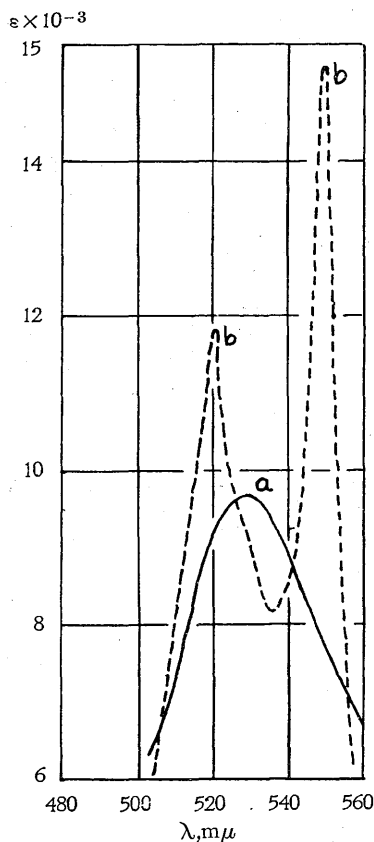


※ チトクロムは鉄ポルフィリンを作用団にもつ呼吸酵素群で、鉄原子の酸化還元により、水素または電子を伝える。チトクロムCはもっとも安定で、筋肉などの動物細胞・細菌・酵母に広く分布する。

D. ペニシリン—チトクロム c 系⁽⁴²⁾

チトクロム c[※]の酸化型(フェリチトクロム c)は $530m\mu$ に吸収帯をもつが、ペニシリンを加えると第29図のように2つの新しい吸収帯 ($520m\mu$ と $550m\mu$) が生れる。チトクロム c だけでは $530m\mu$ にやや巾の広い吸収を示す。このスペクトルがチトクロム c の還元型 (フェロチトクロム c) と一致していること、シス

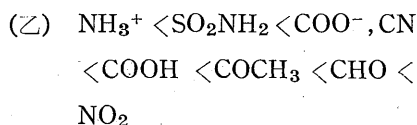
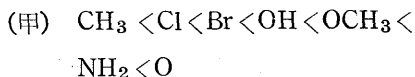
あるから、ペニシレン酸かまたは近縁物質ができている)、中性にもどしてからチトクロム c に加えると第30図にみられるように 520m μ と 550m μ にピークが生じ、フェロチトクロムになったことが示される。ペニシリンからペニシレン酸になる反応は Zn, Cu などにより触媒されるので、生理的条件でも十分この反応はおこりうるし、そうすれば細菌のチトクロム系への干渉が生ずる。ペニシリンの抗菌活性の 1 因子として十分考えられる過程である。



第30図 (a) フェリチトクロム C
(b) 酸性熱処理をしたペニシリン G を加えたもの
pH はいずれも 7.0

E. λ_{\max} の意義⁽⁴³⁾ (山辺の理論)

ベンゼンの種々の mono- 置換体の λ_{\max} (および ϵ_{\max}) をしらべてみると第 7 表の順にベンゼンとの差が大きくなる。置換基をオルト・パラ指向性のもの(甲類)とメタ指向性のもの(乙類)にわけると



の順である。(甲) はベンゼン核に電子をあたえる性質をもち、かつその強さの順になっている。(乙) はベンゼン核から電子を引きつける性質(求電子性)をもち、かつその強さの順になっている。いずれの系統の置換基がベンゼン核に入っても、分子における荷電分布はベンゼンの均一なものからずれるから、上記の順に置換体の双極子モーメント[※](通常 μ という記号であらわされるが、

第7表 ベンゼン mono-置換体の吸収定数⁽¹⁴⁾

化合物	λ_{\max}	ϵ_{\max}	$\Delta\lambda$
ベンゼン	203.5 μ	7,400	基準 0 μ
アニリン(+)*	203	7,500	-0.5
トルエン	206.5	7,000	3.0
Cl-ベンゼン	209.5	7,400	6.0
Br-ベンゼン	210	7,900	6.5
フェノール	210.5	6,200	7.0
アニソール	217	6,400	13.5
SO ₂ NH ₂ -ベンゼン	217.5	9,700	14.0
ベンゾニトリル	224	13,000	20.5
安息香酸(-)*	224	8,700	20.5
安息香酸	230	11,600	26.5
アニリン	230	8,600	26.5
フェノール(-)	235	9,400	31.5
アセトフェノン	249.5	9,800	42.0
ベンツアルデヒド	249.5	11,400	46.0
ニトロベンゼン	268.5	7,800	65.0

※ +印は正イオン、-印は負イオンをあらわす。

波長のミクロンと同じであるから注意を要する) も大きくなる理である。 μ の実測値も大体これと一致する。

ベンゼン di-置換体 (パラ位) では、置換基が同系統から出ているときは上位の値より小さい λ_{\max} となる。例えば $\Delta\lambda$ (COOH) = 26.5, $\Delta\lambda$ (NO₂) = 65.0 であるが、p-(NO₂) (COOH) ベンゼンでは $\Delta\lambda$ = 61.0 で上位の 65.0 より小さい値を示す。置換基が異系統のときは各基の $\Delta\lambda$ の値の数倍にもなる。例えば $\Delta\lambda$ (NH₂) = 26.5, $\Delta\lambda$ (NO₂) = 65.0 であるが、p-(NH₂) (NO₂) ベンゼンでは $\Delta\lambda$ = 177.5 という大きい値が実測されている。同じ傾向が双極子モーメントについてもみられる。 μ (NH₂) = 1.53D, μ (NO₂) = 3.95D であ

※※ 分子の正荷電 (+Q) の中心と負荷電 (-Q) の中心が距離 d をへだててあるとき、 $\mu = Qd$ で表えられる。10⁻¹⁸ cgs 静電単位の程度のものでこれを単位とし、Dなる記号であらわす。

るからモーメントのベクトル加算則からすれば 5.48D が $p\text{-(NH}_2\text{)(NO}_2\text{)}$ ベンゼンの μ の値と考えられるが、実測値は 6.1D でかなり大きい。

さて $p\text{-(NH}_2\text{)(x)}$ ベンゼンでは NH_2 基が (甲) の上位にあるので、 \mathbf{x} として (乙) の上位にある基が入るほど分子の荷電分布は不均一になり、 λ_{\max} および μ は大きくなると考えられる。細菌の発育に必要な $p\text{-(NH}_2\text{)(COOH)}$ ベンゼン、すなわち PABA は生理的条件下では負イオンとしてはたらいっている、 λ_{\max} の値として負イオン型のもの即ち $265\text{m}\mu$ をとる。いま PABA と拮抗的にはたらくサルファ剤 (SA 剤) の λ_{\max} 値と比べてみよう。まず SA であるが、その有効型は負イオンであるから、pH12 以上での値をとらなければならない。即ち第13図から $\lambda_{\max}=251\text{m}\mu$ となるから、 $p\text{-(NH}_2\text{)}$ ベンゼン核から電子を引きつける強さにおいて、 SO_2NH^- 基は COO^- 基に劣ることがわかる。これに対して ST・SP・SD はその負イオン型の λ_{\max} が $258\sim 260\text{m}\mu$ にあって、求電子性の強度が (SA より大きく) PABA に近いことを示している。これら3種のサルファ剤が SA よりすぐれた抗菌性をもっていることを合せ考えると、つぎのような原則に達することができる。SA 剤においてその負イオン型の λ_{\max} が $265\text{m}\mu$ に近いほど抗菌活性は大きくなる。

⁽⁴⁴⁾ Pauling は化合物の示す生物学的活性 (生理作用・薬理効果など) をもっとも強く支配するものが、化学構造ではなく分子の size and shape にあること、したがって構造式の上からまったく異った分子でもそれらの size and shape の相似度が高ければ相似の活性を示すと述べている。さらに最近になって多くの究研者により、分子の荷電分布の相似性がそれら分子の生物学的活性の相同の主因になっていることが明らかにされてきた。上にのべた SA 剤の原則はしたがって、荷電分布の相似性を λ_{\max} であらわして活性と結びつけたともみることができる。吸収スペクトルの測定は装置さえあればかんたんであるから、この原則が他種の薬剤にまで拡張されて適用できるならば薬剤分子の構成にさいして有用なものとなるであろうし、またそれを著者は期待しているものである。

文 献

- (1) Ferguson, L. N.: Electron Structures of Organic Molecules, Constable (1952)
- (2) Cary, H. H., Beckman, A. O.: J. Opt. Soc. Am., **31**, 682 (1941)
- (3) Hughes, H. K.: Analyt. Chem., **24**, 1349 (1952)
- (4) Sheppard, S. E., Geddes, A. L.: J. Am. Chem. Soc., **66**, 1995 (1944)
- (5) Grant, H. S., Jones, J. H.: Analyt. Chem., **22**, 679 (1950)
- (6) Lawendel, J. S.: Nature, **180**, 434 (1957)
- (7) Maier, G. D., Metzler, D. E.: J. Am. Chem. Soc., **79**, 4386 (1957)
- (8) 重松恒信: 比色分析法, 分析化学講座, 共立出版 (1956)
- (9) Mellon, M. G.: Analytical Absorption Spectroscopy, John Wiley & Sons (1950)
- (10) Hilty, W. W.: Analyt. Chem., **21**, 257 (1949)
- (11) Schulz, E. P., Neuss, J. D.: Analyt. Chem., **29**, 1662 (1957)
- (12) Hiscox, D. J.: Analyt. Chem., **23**, 923 (1951)
- (13) Rebstock, M. C., et al.: J. Am. Chem. Soc., **71**, 2458 (1949)
- (14) Doub, L., Vandenbelt, J. M.: ibid., **69**, 2714 (1947)
- (15) Hochstein, F. A., et al.: ibid., **75**, 5455 (1953)
- (16) 古賀正三: pH概説, 共立出版 (1956)
- (17) 富田軍二: pH測定法, 生物学実験法講座, 中山書店 (1955)
- (18) Brode, W. R.: Chemical Spectroscopy, John Wiley & Sons (1943)
- (19) Bell, P. H., Roblin, R. O.: J. Am. Chem. Soc., **64**, 2905 (1942)
- (20) 山辺 茂: 分子構造と薬理作用, 青山書店 (1958)
- (21) Vandenbelt, J. M., Doub, L.: J. Am. Chem. Soc., **66**, 1633 (1944)
- (22) Robinson, E. J., Pehrul, F. F.: ibid., **67**, 1186 (1945)
- (23) 山辺 茂: 薬学研究, **22**, 23 (1950)
- (24) 山辺 茂: rH₂測定法, 生物学実験法講座, 中山書店 (1955)
- (25) ニーランズ・スタンプ著, 中村訳: 酵素化学概論, 朝倉書店 (1956)
- (26) Theorell, H., Bonnichsen, R. K.: Acta Chem. Scand., **5**, 1105 (1951)
- (27) Michaelis, L., Granick, S.: J. Am. Chem. Soc., **67**, 1212 (1945)
- (28) 寺山 宏: 化学の領域, **1**, No.3, 84 (1947)
- (29) Weissman, N., et al.: J. Am. Chem. Soc., **74**, 1423 (1952)
- (30) 山辺 茂: 未発表論文
- (31) Branch, G. E. K., Calvin, M.: The Theory of Organic Chemistry, Prentice-Hall, Inc. (1943)

- (32) Ferguson, L. N.: Chem.Rev., **43**, 385 (1948)
- (33) Lewis, G. N.: J. Am. Chem. Soc., **67**, 770 (1945)
- (34) Heilbrunn, L. V.: The Dynamics of Living Protoplasm, Academic Press, Inc. (1956)
- (35) Kelly, J. W.: Arch. Biochem., **55**, 130 (1955)
- (36) Klotz, I. M.: Chem. Rev., **41**, 373 (1947)
- (37) Klotz, I. M., et al.: J. Am. Chem. Soc., **68**, 1486 (1946)
- (38) Klotz, I. M.: ibid., **68**, 2299 (1946)
- (39) Snell, E. E.: Physiol. Rev., **33**, 509 (1953)
- (40) Chance, B.: Rev. Sci. Instruments, **22**, 619 (1951)
- (41) Chance, B.: Adv. in Enzymology, **12**, 153 (1951)
- (42) Klotz, I. M., Urquhart, J. M., Weber, W.W.: Arch. Biochem., **26**, 420 (1950)
- (43) 山辺 茂: 未発表論文
- (44) Pauling, L.: Chem. Eng. News, **24**, 1375 (1946)

Yamabe, Shigeru

**Absorption Spectra of the Organic Molecules
having Biological Activities, [I] Ultraviolet and Visible**

Résumé

In this publication the ultraviolet~visible absorption spectra of the organic compounds which act catalytically in biochemical reactions, are studied. On the basis of theories of light absorption, spectral data can be analysed qualitatively or quantitatively, which are of valuable assistance to the advanced study of this field of science. The refined knowledges of absorption spectra are useful for, i) determination of molecular structures, ii) measurement of some physico-chemical constants including pH , pK and redox potential, iii) quantitative analysis, particularly available to determine the extent to which dyes, drugs or substrates combine with biopolymers, iv) elucidation of mechanisms of drug actions or enzyme reactions.

The author's concept of the way in which wavelength of max. absorption of sulfa-drugs can be correlated with their bacteriostatic activities, is also presented.